

3/5/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

014334215

WPI Acc No: 2002-154918/200220

XRAM Acc No: C02-048492

**New fusion protein of hirudin and tick anticoagulant protein, useful as an anticoagulant**

Patent Assignee: AVENTIS PHARMA DEUT GMBH (AVET )

Inventor: HABERMANN P

Number of Countries: 094 Number of Patents: 003

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 200204486	A2	20020117	WO 2001EP7333	A	20010627	200220 B
DE 10033195	A1	20020321	DE 1033195	A	20000707	200227
AU 200187562	A	20020121	AU 200187562	A	20010627	200234

Abstract (Basic): WO 200204486 A2

NOVELTY - Bifunctional fusion protein (I) comprising hirudin, or its variant, (II) and tick anticoagulant protein (TAP) or its variant (III), is new.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) DNA (IV) encoding (I);
- (2) plasmid containing (IV);
- (3) cells containing (IV) or the plasmid; and
- (4) recombinant production of (I).

ACTIVITY - Anticoagulant. No details of tests for anticoagulant activity are given.

MECHANISM OF ACTION - (II) inhibits thrombin and (III) inhibits factor Xa.

USE - (I) is used to inhibit coagulation of blood.

ADVANTAGE - In (I) both components are active without need for enzymatic activation or cleavage, and both retain the activity of the individual proteins, eliminating the need for separate administrations. (I) have a longer half-life than single proteins, so smaller doses are required, reducing the risk of bleeding, and they provide a strong and long-lasting antithrombotic effect.

pp; 36 DwgNo 0/5

Title Terms: NEW; FUSE; PROTEIN; HIRUDIN; TICK; ANTICOAGULANT; PROTEIN; USEFUL; ANTICOAGULANT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-014/00; C07K-019/00

International Patent Class (Additional): A61K-038/36; C07K-014/815

File Segment: CPI

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 100 33 195 A 1

51 Int. Cl. 7:  
C 07 K 19/00  
C 07 K 14/815  
A 61 K 38/36

21 Aktenzeichen: 100 33 195.5  
22 Anmeldetag: 7. 7. 2000  
43 Offenlegungstag: 21. 3. 2002

DE 100 33 195 A 1

71 Anmelder:  
Aventis Pharma Deutschland GmbH, 65929  
Frankfurt, DE

72 Erfinder:  
Habermann, Paul, Dr., 65817 Eppstein, DE

56 Entgegenhaltungen:  
DE 3 24 712 A2

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- 54 Bifunktionale Fusionsproteine aus Hirudin und TAP  
57 Die Erfindung betrifft bifunktionale Fusionsproteine, die Hirudin oder eine Variante von Hirudin und TAP (Tick Anticoagulant Peptide) oder eine Variante von TAP enthalten, die Herstellung und Verwendung der bifunktionalen Fusionsproteine sowie Arzneimittel, die diese bifunktionalen Fusionsproteine enthalten.

DE 100 33 195 A 1

- [0001] Die Erfindung betrifft bifunktionale Fusionsproteine, die Hirudin oder eine Variante von Hirudin und TAP (Tick Anticoagulant Peptide) oder eine Variante von TAP enthalten, die Herstellung und Verwendung der bifunktionalen Fusionsproteine sowie Arzneimittel, die diese bifunktionalen Fusionsproteine enthalten.
- [0002] Die Komplexität des humanen Blutgerinnungssystems bedingt die Einbeziehung einer Vielzahl von Blutgerinnungsfaktoren. Diese können Proteinfamilien entstammen, deren Mitglieder gemeinsame strukturelle Eigenschaften aufweisen, andererseits aber aufgrund während der Evolution entwickelter geringfügiger strukturelle Änderungen durch spezifische Wechselwirkung mit jeweils einer anderen Zielstruktur spezifisch wirken. Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft der Mitglieder dieser Proteinfamilien und der während der Evolution entwickelten Spezifität ist es sehr schwierig, chemisch synthetisierte Moleküle zu finden, die einerseits hochspezifisch mit einem der Mitglieder interagieren andererseits aber mit den anderen Mitgliedern der Familie nicht interagieren, so daß bei therapeutischer Anwendung das Risiko von Nebenwirkungen minimiert ist.
- [0003] Blutsaugende Parasiten verfügen über hunderte von Millionen von Jahren Evolution entwickelte Peptide, die spezifische mit Blutgerinnungsfaktoren wechselwirkend und dadurch den Wirt nur wenig schädigen. Dabei wurden während der Evolution Wirt-Parasit spezifische Mechanismen der Gerinnungshemmung entwickelt.
- [0004] Blutegel vom Typ *Hirudo* entwickelten z. B. verschiedene Isoformen des Thrombininhibitors Hirudin. Durch künstliche Variation des Moleküls, z. B. Austausch der N-terminalen Aminosäure, wurde Hirudin für pharmazeutisch technische Anforderungen optimiert (z. B. EP 0 324 712).
- [0005] Andere Blutegel wie z. B. *Hementeria giganti* entwickelten Proteine die Blutgerinnsel auflösen und ähnlich dem humanen tPA (Tissue Plasminogen Activator) wirken. Tuszyński et al. (J. of Biol. Chem. (1987), 262, 9718-9723) beschreiben ein ca. 17000 dt großes Protein, das aus dem mexikanischen Blutegel isoliert werden kann und ein Inhibitor des Blutgerinnungsfaktors Xa ist.
- [0006] Auch Zecken haben Thrombininhibitoren entwickelt. EP 0 345 616 beschreibt ein Protein Amblyommin, welches aus afrikanischen Schildkröten isoliert werden kann. Amblyommin inhibiert Thrombin, obwohl es eine von Hirudin verschiedene Primärstruktur hat.
- [0007] Dies zeigt, daß bei gleichem Zielprotein dennoch verschiedene inhibitorische Proteine, die eine ähnliche Wirkung haben, während der Evolution entwickelt wurden. Weichzecken wie *Ornithodoros moubata*, haben Inhibitoren des Blutgerinnungsfaktors Xa entwickelt. Das Polypeptid TAP (Tick Anticoagulant Peptide) (Waxman L. et al. (Science 248pp. 595-596; 1990) hemmt spezifisch den Blutgerinnungsfaktor Xa, der inaktives Prothrombin in aktives Thrombin umwandelt. US 5,239,058 und US 5,328,997 beschreiben TAP und dessen Herstellung.
- [0008] Diese Beispiele zeigen, daß verschiedene Stufen der Blutgerinnungskaskade (verschiedene Blutgerinnungsfaktoren) als Ziel der Gerinnungshemmung während der Evolution entwickelt wurden und der Mechanismus der Hemmung spezifisch von einzelnen Tierspezies je nach den individuellen Lebensumständen optimiert wurde.
- [0009] Von großem pharmazeutischen Interesse sind Proteine, die die Eigenschaften von verschiedenen dieser Inhibitoren miteinander kombinieren, so daß synthetische bifunktionale Proteine entstehen.
- [0010] Seno et. al. (FEBS Letters 199, pp. 187-192 1986) und EP 0 288 809 beschreiben das Prinzip synthetischer bifunktionaler (bifunktionaler) Proteine. Grundlage für diese Proteine sind Polypeptide, die immunologisch wirksam sind und der Gruppe der Lymphokine und Interferone entstammen. EP 0 227 938 beschreibt für die Konstruktion von Fusionsproteinen die Verwendung einer Faktor Xa-Spaltstelle als Bindeglied zwischen Interleukin-2 und einem zweiten Teilprotein, das vorzugsweise Proinsulin oder Hirudin ist. Über die Faktor Xa-Spaltstelle kann das Protein von Interesse abgetrennt werden. Im Fusionsprotein weist Interleukin-2 keine Interleukin-2 Aktivität auf.
- [0011] EP 0 502 968 beschreibt eiweißartige Plasminogenanaloga, die durch ein an der Blutgerinnung beteiligtes Enzym, wie z. B. Faktor Xa spaltbar sind, wodurch eine Verbindung mit Plasmin-Aktivität gebildet wird. Zunächst werden inaktive Fusionsproteine, bestehend z. B. aus Hirudin und Streptokinase über diese Spaltstelle fusioniert und nach Injektion in das Blutkreislaufsystem durch Enzyme der Gerinnungskaskade, z. B. durch den Faktor Xa gespalten, wodurch die jeweils aktive Form des Teilproteins, z. B. Hirudin und Streptokinase (Hemmung der Blutgerinnselbildung durch Hirudin und Fibrinolyse durch Streptokinase) gebildet werden. Die Fusionsproteine wirken als "Prodrug"; d. h. sie müssen erst durch Spaltung in ihre aktive Form überführt werden. Als Prodrug sind sie nicht oder nur in geringem Maße aktiv. Das hat unter anderem den Nachteil, daß z. B. im Fall einer massiven Verletzung, wie z. B. der Bildung von Thromben nach einer Operation, diese Fusionsproteine nicht sofort – sondern erst nach Aktivierung bzw. Spaltung – und auch nicht in so ausreichendem Maße wirken, daß die Gefahr der Blutgerinnselbildung unterdrückt wird.
- [0012] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein bifunktionales Fusionsprotein herzustellen, wobei beide Teilproteine bereits im Fusionsprotein aktiv sind und wobei beide Teilproteine die Blutgerinnung hemmen.
- [0013] Gegenstand der Erfindung ist ein bifunktionales Fusionsprotein, daß Hirudin oder eine Variante von Hirudin und TAP oder eine Variante von TAP enthält.
- [0014] Überraschend wurde gefunden, daß mit Hirudin und dem aus Weichzecken isolierten Faktor Xa – Inhibitorpeptid Tick Anticoagulant Peptide (nachfolgend TAP) Fusionsproteine gebildet werden können, die bifunktional aktiv sind, d. h. beide Teilproteine des bifunktionalen Fusionsproteins – Hirudin und TAP – sind bereits ohne vorherige enzymatische Aktivierung bzw. Spaltung aktiv.
- [0015] Da beide Funktionen – einerseits Hirudin oder eine Variante von Hirudin und andererseits TAP oder eine Variante von TAP – bereits im Fusionsprotein aktiv sind, ist eine Spaltung in die Teilproteine – d. h. in Hirudin oder eine Variante von Hirudin einerseits und TAP oder eine Variante von TAP andererseits – für die Aktivität der Teilproteine keine notwendige Voraussetzung.
- [0016] Vorzugsweise ist in diesen synthetischen bifunktionalen Fusionsproteinen jede einzelne Eigenschaft bzw. Funktion vergleichbar effizient zu der des jeweiligen Ausgangsproteins. Für eine pharmazeutische Anwendung brauchen die Teilproteine dann nicht getrennt oder als Mischung dargereicht zu werden. Die bifunktionalen Proteine haben verbesserte Halbwertszeiten, so daß von jedem Teilprotein weniger appliziert werden muß, als bei einzelner Darreichung. Ein Vorteil

ist, daß dadurch das Blutungsrisiko verringert werden kann.

[0017] Darüber hinaus interagieren die beiden Teilproteine mit verschiedenen Zielen der Blutgerinnungskaskade. Dies hat den Vorteil, daß in akuten Situationen gleichzeitig durch Hirudin (welches Thrombin inhibiert), die Gerinnselbildung gehemmt und durch TAP die Neubildung von Thrombin aus Prothrombin, die über die enzymatische Aktivität des Faktor Xa abläuft, verhindert wird. Dadurch wird die antithrombotische Wirkung verlängert und verstärkt.

[0018] Die Erfindung beinhaltet die Verwendung von Hirudin und Hirudin Varianten in dem bifunktionalen Fusionsprotein. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine der natürlichen Isoformen des Hirudins (die natürlichen Isoformen werden zusammen als "Hirudin" bezeichnet) verwendet. Eine natürliche Isoform ist z. B. Val-Val-Hirudin. In anderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine Variante einer natürlichen Hirudin Isoform eingesetzt. Eine Variante leitet sich von einer natürlichen Isoform des Hirudins ab, enthält aber z. B. zusätzliche Aminosäuren und/oder Aminosäuredeletionen und/oder Aminosäureaustausche im Vergleich zu der natürlichen Isoform. Eine Variante von Hirudin kann alternierend Peptidabschnitte natürlicher Isoformen des Hirudins und neue Aminosäuren enthalten. Beispielsweise kann eine Variante von Hirudin eine natürliche Sequenz von bis zu 15 Aminosäuren mit einer kurzen, vorzugsweise 6-20 Aminosäure langen neuen Sequenz verknüpfen, vorzugsweise kann dadurch eine Hirudin-Variante erzeugt werden, die keine Disulfidbrücken enthält. Varianten des Hirudins sind bekannt und z. B. in DE 34 30 556 beschrieben. Eine besondere Ausführungsform betrifft die Hirudin-Variante Refludan (Leu-Hirudin, auch bezeichnet als [Leu<sup>1</sup>,The<sup>2</sup>]-63-Desulfatohirudin bzw. Lepirudin; beschrieben in EP-B 0 324 12 Sequenz Nummer 4; SEQ ID NO. 15). Eine weitere besondere Ausführungsform betrifft Hirudin-Varianten mit verzögerter Wirkung (z. B. PEG-Hirudin, beschrieben in EP 0 345 616). Eine besondere Ausführungsform betrifft Hirudin und Hirudin-Varianten, die gegenüber den natürlichen Isoformen oder Varianten am N-Terminus und/oder C-Terminus verkürzt sind. Vorzugsweise hat eine Hirudin-Variante 80% oder mehr Homologie (Aminosäureidentität) zu einer natürlichen Isoform des Hirudins.

[0019] In analoger Weise können Isoformen und Varianten von TAP verwendet werden. In besonderen Ausführungsformen wird eine natürliche Isoform von TAP (natürliche Isoformen werden zusammen als "TAP" bezeichnet) verwendet z. B. TAP gemäß SEQ ID NO. 17 oder Waxman (Waxman et al. (1990) Science 248, 595-596). In anderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine Variante von TAP verwendet. Eine Variante von TAP leitet sich von einer natürlichen Isoform des TAPs ab vorzugsweise von SEQ ID NO. 17, enthält aber z. B. zusätzliche Aminosäuren und/oder Aminosäuredeletionen und/oder Aminosäureaustausch (Mutationen) im Vergleich zur natürlichen Isoform. Eine besondere Ausführungsform betrifft TAP Varianten, die gegenüber der natürlichen Isoform oder TAP Varianten, vorzugsweise gegenüber SEQ ID NO. 17, am N-Terminus und/oder C-Terminus verkürzt sind. Vorzugsweise hat eine TAP-Variante 80%, besonders bevorzugt 90% oder mehr Homologie (Aminosäureidentität) zu einer natürlichen Isoform des TAPs, vorzugsweise zu SEQ ID NO. 17.

[0020] Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein bifunktionales Fusionsprotein, bei dem die Teilproteine über einen Spacer miteinander verbunden sind. Dieser Spacer besteht vorzugsweise aus 1 oder mehreren Aminosäuren, vorzugsweise maximal 10 Aminosäuren. Beispiele für Spacer sind: -Asp-Pro- und -Ala-Ile-Glu-Gly-Arg-.

[0021] Eine besondere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein bifunktionales Protein, bei dem die beiden Teilproteine über eine Faktor Xa-Spaltstelle verknüpft sind. Dies hat den Vorteil, daß Spuren von nicht inaktiviertem Faktor Xa eine zusätzliche Spaltstelle als Substrat in Konkurrenz zu der natürlich vorhandenen Spaltstelle im Prothrombin angeboten wird. Durch diese Substratinhibition wird ein weiterer vorteilhafter Begleiteffekt erzielt. Überraschenderweise werden dabei weder die Hirudinvirkung noch die TAP-Wirkung beeinträchtigt.

[0022] Besondere Ausführungsformen der Erfindung betreffen die Fusionsproteine

- Hir<sub>1-63</sub>TAP<sub>2-60</sub> (Aminosäuren 1-63 des Hirudins gemäß SEQ. ID. NO. 15, Aminosäuren 2-60 des TAPs gemäß SEQ ID NO. 17) Teile der Sequenz sind in Fig. 1 (SEQ ID NO. 7) gezeigt;
- Hir<sub>1-65</sub>-AspPro-TAP<sub>1-60</sub> (Fusionsproteine enthaltend Aminosäuren 1-65 des Hirudins gemäß SEQ ID NO. 15, einen Spacer (Asp, Pro) und die Aminosäuren 1-60 aus TAP gemäß SEQ ID NO. 17);
- Hir<sub>1-63</sub>-Ala Ile Glu Gly Arg-TAP<sub>1-60</sub>(Gly 34) (Aminosäuren 1-63 aus Hirudin gemäß SEQ ID NO. 15, einen Spacer, (-Ala Ile Glu Gly Arg-) mit einer Erkennungsstelle für Faktor Xa Protease; Aminosäuren 1-60 aus TAP gemäß SEQ ID NO. 17) wobei in Position 34 der TAP-Sequenz ein Glycin (Gly 34) eingeführt ist,
- Ala-Hir<sub>(2-63)</sub>-Ala Ile Glu Gly Arg-TAP<sub>(1-60)</sub> (Aminosäure Ala N-Terminus; Aminosäuren 2-63 des Hirudins gemäß SEQ ID NO. 15, Spacer-Ala Ile Glu Gly Arg-; Aminosäuren 1-60 aus TAP gemäß SEQ ID NO. 17; das Fusionsprotein enthält an Position 34 der TAP-Peptidsequenz ein Glycin).

[0023] Gegenstand der Erfindung ist auch ein bifunktionales Fusionsprotein, das eine der Signalsequenzen SEQ ID NO. 18-27, vorzugsweise SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21 oder SEQ ID NO. 22 enthält (Tabelle 1, DE 19 944 870.1).

[0024] Gegenstand der Erfindung ist auch eine Nukleinsäure, vorzugsweise DNA, die für das bifunktionale Fusionsprotein kodiert. Beispielsweise enthält die DNA eine der Sequenzen SEQ ID NO. 14 (kodiert für Leu-Hirudin) und/oder SEQ ID NO. 16 (kodiert für TAP) oder Teile dieser Sequenzen. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung, enthält die DNA außerdem eine Sequenz, die für eine der Signalsequenzen aus Tabelle 1 kodiert.

[0025] Vorzugsweise wird das Fusionsprotein durch eine DNA kodiert, die für Hirudin oder eine Hirudin-Variante und TAP oder eine TAP-Variante kodiert. Die für das bifunktionale Fusionsprotein kodierende DNA liegt vorzugsweise in einem Plasmid vor, z. B. dem Plasmid pK152 (EP 0 448 093; Europäische Patentanmeldung Nr. 8 974 322). Das Plasmid pK152 enthält die Sequenz für Hirudin gemäß EP 0 324 712. Gegenstand der Erfindung ist eine DNA, die für das bifunktionale Fusionsprotein kodiert sowie ein Plasmid, das diese DNA enthält. Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung einer DNA, die für das bifunktionale Fusionsprotein kodiert und die Verwendung eines Plasmids, das diese DNA enthält.

[0026] Gegenstand der Erfindung ist auch eine Zelle, eukaryotisch oder prokaryotisch, die eine DNA, die für das bifunktionale Fusionsprotein kodiert, z. B. vorliegend in einem Plasmid, enthält.

[0027] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung des bifunktionalen Fusionsproteins. Vorzugsweise wird das bifunktionale Fusionsprotein durch heterologe Expression in rekombinanten eukaryotischen Zellen – z. B. Hefe- oder rekombinanten prokaryotischen Zellen – z. B. E. coli, z. B. E. coli K12 MC 1061 (Sambrook et al. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) – hergestellt. Es wurde überraschend gefunden, daß sich ein bifunktionales Fusionsprotein aus Hirudin und TAP in E. coli exprimieren läßt, wobei hohe Ausbeuten, vergleichbar der Expression von Lepirudin in Grammmengen in das Nährmedium abgegeben werden. Dies ist besonders überraschend, da das bifunktionale Fusionsprotein bis zu 12 für die biologische Funktion wichtige Cysteinreste enthält. TAP enthält sechs Cysteine, die drei zusätzliche Cysteinbrücken ausbilden können. Beide funktionalen Gruppen des durch Expression in E. coli erhaltenen bifunktionalen Fusionsproteins sind biologisch aktiv. Die funktionale Aktivität kann wie in Beispiel 1 (Bestimmung der Hirudin-Aktivität nach Griebach et al.) und Beispiel 2 (Bestimmung der Aktivität von TAP nach der in EP 0 454 372 beschriebenen Methode) beschrieben, bestimmt werden. Vorteilhaft ist auch, daß das bifunktionale Fusionsprotein bei der Expression in E. coli ins Medium ausgeschleust wird, insbesondere, wenn eine der Signalsequenzen aus DE 19 944 870.1 verwendet wird.

[0028] Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung des bifunktionalen Fusionsproteins, wobei vorzugsweise die Signalsequenzen, die in DE 199 44 870.1 beschrieben sind, verwendet werden. DE 199 44 870.1 beschreibt Vektoren und Signalsequenzen, die die Expression und von Sekretion von Hirudin und Hirudin Varianten sowie des bifunktionalen Fusionsproteins in das Fermentationsmedium erlauben. EP 0 448 093 beschreibt diesen Prozeß für die Hirudin Variante Ala-Hirudin (Beispiel 6). Aus dem Medium bzw. Zellüberstand kann das biologisch aktive bifunktionale Fusionsprotein isoliert werden.

[0029] Da das bifunktionale Fusionsprotein im Medium bzw. Zellüberstand gefunden wird, lassen sich die bifunktionalen Fusionsproteine über kostengünstige und einfache Verfahren, z. B. gemäß dem in EP 0 549 915 beschriebenen Verfahren, herstellen.

[0030] In besonderen Ausführungsformen wird das aufgereinigte bifunktionale Fusionsprotein anschließend gefriergetrocknet.

[0031] Gegenstand der Erfindung ist auch ein bifunktionales Fusionsprotein, enthaltend Hirudin oder eine Hirudin-Variante und TAP oder eine TAP Variante, das auch eine Signalsequenz, vorzugsweise eine in DE 199 44 870.1 beschriebene enthält (Tabelle 1). Vorzugsweise enthält das Fusionsprotein eine der Signalsequenzen SEQ ID NO. 18, SEQ ID NO. 19, SEQ ID NO. 20, SEQ ID NO. 21 oder SEQ ID NO. 22. Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der Signalsequenzen aus DE 199 44 870.1 bzw. Tabelle 1 zur Herstellung des bifunktionalen Fusionsproteins, wobei die Signalsequenz im Verlauf der Expression durch E. coli abgespalten wird.

[0032] Gegenstand der Erfindung sind auch bifunktionale Fusionsproteine, die an einen Träger gekoppelt sind. Vorzugsweise erfolgt die Kopplung über Hirudin oder die Hirudin-Variante, beispielsweise wie in EP 0 345 616 beschrieben. Als Träger wird beispielsweise PEG (Polyethylenglykol) oder Dextran verwendet.

[0033] Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der bifunktionalen Fusionsproteine, insbesondere als pharmazeutischer Wirkstoff. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das das bifunktionale Fusionsprotein enthält; insbesondere ein Verfahren, wobei zuerst das bifunktionale Fusionsprotein hergestellt und dieses dann mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger und gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen gemischt wird. Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel, das ein bifunktionales Fusionsprotein und ggf. weitere Zusatzstoffe und geeignete pharmazeutische Träger enthält. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, hergestellt durch Mischung und Gefrierdrying. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Arzneimittel für die orale oder nasale Applikation. Insbesondere betrifft die Erfindung ein Nasal Spray, das das bifunktionale Fusionsprotein enthält sowie die Verwendung des Nasal Sprays insbesondere für akute Angina pectoris. Gegenstand der Erfindung sind auch Arzneimittel, die ein bifunktionales Fusionsprotein, gebunden an einen Träger, enthalten.

[0034] Das bifunktionale Fusionsprotein bzw. ein Arzneimittel, das dieses bifunktionale Fusionsprotein enthält, kann zur Behandlung und Prävention von thrombotischen Ereignissen verwendet werden. Sie eignen sich insbesondere z. B. zur Prophylaxe venöser und arterieller Thrombosen, zur Verhinderung der Verbrauchskoagulopathie oder zur Behandlung der instabilen Angina pectoris.

Fig. 1

[0035] Fig. 1 zeigt die Sequenz des DNA-Fragmentes, das für die Aminosäuren 57–63 aus Lepirudin und 2–60 aus TAP kodiert.

Fig. 2

[0036] Fig. 2 zeigt die Sequenz der Oligonukleotide hir 65\_DP\_zehna 1 und hir 65\_DP\_zehna 2, die zusätzlich zu den Oligonukleotiden Zehna3 bis zehna6 aus Fig. 1 zur Konstruktion von Lepirudin (1–65)-Asp, Pro-TAP (1–60) benötigt werden. Dabei markieren die unterstrichenen Sequenzbereiche die Codone für die neu eingeführten Aminosäuren.

Fig. 3

[0037] Fig. 3 zeigt die Oligonukleotide, die zusätzlich zu den in Fig. 1 beschriebenen Sequenzen zehna5/6 zur Konstruktion von Lepirudin (1–63)-Ala, Ile, Glu, Gly, Arg-TAP (1–60) benötigt werden.

[0038] Die unterstrichenen Sequenzabschnitte markieren die jeweils beschriebenen Änderungen.

Fig. 4

[0039] Darstellung der DNA-(SEQ ID NO. 14) und Aminosäuresequenz (SEQ ID NO. 15) von Lepirudin (Leu-Hiru-

din). Die Sequenz entspricht der Sequenz aus pk152.

### Fig. 5

[0040] Darstellung der DNA-(SEQ ID NO. 16) und Aminosäuresequenz (SEQ ID NO. 17) von TAP.

Beispiele

Beispiel 1

Bestimmung der Hirudinaktivität

[0041] Die Bestimmung der Hirudinkonzentration wird entsprechend der Methode von Griebach et al. (Thrombosis Research 37, 347-350, 1985) "Chromogenic assay" durchgeführt. Dazu werden definierte Mengen einer Lepirudin-Standardlösung (z. B. Hirudin Variante (Leu Hirudin) aus EP 0 324 712) zur Erstellung einer Eichkurve in die Meßreihe mit einbezogen. Damit kann die Ausbeute direkt in mg/l angegeben werden.

Beispiel 2

Bestimmung der Aktivität des Zecken antikoagulatorischen Peptides (TAP)

[0042] Die Verifikation der Expression von aktiven TAP-Protein kann entsprechend der Beschreibung in EP 0454 372 B1 durchgeführt werden. Die bakteriellen Überstände können dazu 1 : 5 und dann in einer Verdünnungsreihe mit in einem Puffer aus 50 mM Tris (pH 7,5-8,0), 150 mM NaCl 0,1% BSA und 10% DMSO verdünnt werden. Zur Bestimmung der Inhibitorkonstante wird die mit Hirudin oder Lepirudin ermittelte Proteinkonzentration und das Molekulargewicht des jeweiligen bifunktionalen Fusionsproteins zugrunde gelegt. Die Festlegung der Konstante kann entsprechend der Beschreibung von Waxman et al. (Science (1990) 248, 595-596) erfolgen.

Beispiel 3

Konstruktion von Hir<sub>1-63</sub> TAP<sub>2-60</sub> Hybrid (DNA, die für Fusionsprotein Hirudin-TAP kodiert)

[0043] Zur Konstruktion der dieses Protein kodierenden DNA-Sequenz wird das Plasmid pK152, das die Sequenz für Hirudin gemäß EP 0 324 712 enthält, verwendet.

[0044] Zur Konstruktion des Expressionsplasmides wird beispielhaft der in DE 129 44 870.1 in Beispiel 1 beschriebene Vektor (Laborbezeichnung pD2B) benutzt. Die das TAP kodierende DNA-Sequenz wird synthetisch hergestellt. Dazu werden 6 Oligonukleotide - Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 6 - z. B. mit Hilfe des Expedite Synthesegerätes (PerSeptive Biosystems) hergestellt. Diese Oligonukleotide haben folgende Bezeichnungen und Sequenzen:

SEQ ID NO. 1: (hir63\_zehna1)

GluTyrAsn

5' - CGAAGAGATCCCTGAGGAATACAACCGTCTGTGCATCAAACCGGTGACTGGATC - 3'

SEQ ID NO. 2: (hir63\_zehna2)

5' - GCATTCGTTCGATCCAGTCACGCGTTTGATGCACAGACGGTTGTATTCCTCAGGGATCTC TT - 3'

SEQ ID NO. 3: (Zehna3)

5' - GAATGCGACTCCAACGAAGGTGGTGAACGTGCTTACTTCCGTAACGGTAAAGGTGGTTGCGATTCTTTC  
TGGATCTGCCC - 3'

SEQ ID NO. 4: (Zehna4)

5' - TCTTCCGGGCAGATCCAGAAGGAATCGCAACCACCTTTACCGTTACGGAAGTAAGCACGTTACACCACCTT  
CGTTGGAGTC - 3'

SEQ ID NO. 5: (Zehna5)

5' - GGAAGACCACACCGGTGCTGACTACTACTCCTACCGTGACTGCTTCAACGCTTGCATCTAATGA - 3'

5'-AGCTTCATTAGATGCAAGCGTTGAAGCAGTCACGGTAGGAGGAGTAGTAGTCAGCACCGGTGTGG-3'

[0045] Die drei in der Sequenz SEQ ID NO. 1 in Aminosäuren übersetzten Codone markieren den Übergang von Hirudin nach TAP (Fig. 1).

[0046] Auf der für das bifunktionale Fusionsprotein kodierenden DNA (SEQ ID NO. 7) sind die Oligonukleotide so angeordnet, daß drei Blöcke hir63-zehna1 und hir63-zehna2, zehna3 und zehna4 sowie zehna5 und zehna6 als Sense und Antisense-Stränge entstehen, die miteinander hybridisieren können. Dabei entstehen 5' überhängende Enden, die jeweils mit dem überhängenden Ende des nächsten Blockes hybridisieren und ligiert werden können. Fig. 1 verdeutlicht das Schema. Die überhängenden Enden am Anfang und am Ende der für TAP kodierenden Sequenz stellen jeweils eine Hälfte der Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme Bstb1 und Hind3 dar. Diese können für die Klonierung der in Fig. 1 dargestellten DNA (SEQ ID NO. 7) verwendet werden.

[0047] Zur Herstellung der in Fig. 1 dargestellten DNA werden je 1 µg der 6 Oligonukleotide in 1 ml H<sub>2</sub>O vereint und anschließend 10' bei 94°C dann 20' bei 65°C inkubiert. Am Ende der Hybridisierungsreaktion wird das Gemisch in ein Eisbad überführt. Von dem Ansatz wird ein Aliquot von 150 µl entnommen und in eine T4-Ligasereaktion eingesetzt.

[0048] Die Reaktionsprodukte werden mittels Ethanol-fällung konzentriert und über ein 8%-iges PAA-Gel voneinander getrennt. Die DNA-Bande, die der erwarteten Größe von ca. 200 bp der in Fig. 1 abgebildeten DNA (SEQ ID NO. 7) entspricht, wird ausgeschnitten und aus dem Gelstück isoliert. Nach Elution und Reinigung wird das Fragment in das mit Bstb1 und Hind3 geöffnete Plasmid pK152 in einer T4-Ligasereaktion inseriert. Kompetente Zellen des Stammes E. coli MC1061 werden mit den Ligationsprodukten transformiert und von Transformanten Plasmid-DNA isoliert und charakterisiert. Von einem Klon wird das inserierte DNA-Fragment über Sequenzanalyse als richtig identifiziert. Die Plasmid-DNA dieses Klones dient als Ausgangsmaterial für die weitere Klonierung. Sie enthält die DNA, die für das gewünschte Hirudin-TAP Fusionsprotein kodiert.

[0049] Das Bstb1/Hind3-Fragment wird aus dem Plasmid reisoliert und in das Plasmid pD2B in einer T4-DNA-Ligasereaktion inseriert. Kompetente Zellen des Stammes E. coli K12 MC1061 (Sambrook et al. "Molecular Cloning" (Old Spring Harbor Laboratory Press 1989) werden mit dem Ligationsgemisch transformiert und von Transformanten Plasmid-DNA zur Charakterisierung isoliert. Parallel wird von den über Plasmidanalyse charakterisierten Transformanten eine Erhaltungsplatte angelegt. Ausgehend von dieser Platte werden Expressionsexperimente wie in Beispiel 3 von EP 0 549 915 beschrieben, durchgeführt.

[0050] Die Zellen werden nach Expression abzentrifugiert und die klaren Überstände auf Hirudinwirkung und TAP-Aktivität überprüft. Als Kontrolle dient ein Expressionsüberstand von rekombinanten E. coli MC1061-Zellen, die mit dem Plasmid pD2B transformiert sind. Es zeigt sich, daß die entwickelte Hirudinaktivität in den Überständen aus Kontrollversuch und Expression des bifunktionalen Fusionsproteins vergleichbar hoch sind. Die Konstante der Faktor Xa Inhibition wird im nanomolaren Bereich bestimmt, während im Kontrollversuch keine bzw. nur geringe inhibitorische Wirkung beobachtet wird. Die Ergebnisse zeigen, daß das bifunktionale Fusionsprotein beide Wirkungen voll entfaltet und das E. coli Varianten überraschend in der Lage sind dieses Protein in aktiver Form auszuschleusen.

#### Beispiel 4

##### Konstruktion von Hir<sub>(1-65)</sub>-Asp Pro-TAP<sub>(1-60)</sub>

[0051] Das Beispiel beschreibt die Herstellung und Expression eines bifunktionalen Fusionsproteins, das die vollständige Sequenz des Hirudin und des TAP umfaßt. Beide Proteine sind durch ein Brückenglied (Spacer) der Form Asp-Pro voneinander getrennt. Zur Konstruktion geht man entsprechend Beispiel 3 vor. Dabei werden aber die Oligonukleotide mit den Sequenzen SEQ ID NO. 1 (hir63\_zehna1) und SEQ ID NO. 2 (hir63\_zehna2) durch die Sequenzen SEQ ID NO. 8 (hir65\_DP\_zehna1) und SEQ ID NO. 9 (hir65\_DP\_zehna2) ersetzt (vgl. Fig. 2).

[0052] Nach Expression ergibt sich eine zu Beispiel 3 vergleichbare Ausbeute an bifunktionalem Fusionsprotein, das sowohl wie Hirudin als auch wie TAP wirkt.

#### Beispiel 5

##### Konstruktion Hir<sub>(1-63)</sub>-Ala Ile Glu Gly Arg-TAP<sub>(1-60)</sub>(Gly34)

[0053] Das Beispiel beschreibt die Konstruktion eines hybriden Protein, das in Position 64 der Hirudinsequenz Alanin anstelle von Leucin und die Aminosäure 65-Glutamin-deletiert enthält und in Position 34 des TAP Protein die Aminosäure Glycin statt Asparaginsäure trägt. Beide Mutationen sind für das jeweilige Einzelprotein nicht beschrieben. Getrennt werden die beiden Fusionspartner durch die Erkennungsstelle Ile Glu Gly Arg der Faktor Xa Protease.

[0054] Zur Konstruktion der das Protein kodierenden DNA-Sequenz geht man entsprechend Beispiel 3 vor. Man benötigt aber vier neue Oligonukleotide (vgl. Fig. 3).

[0055] Nach Expression ergibt sich eine zu Beispiel 3 vergleichbare Ausbeute an hybriden Protein, das sowohl wie Hirudin als auch wie TAP wirkt. Basierend auf der gemessenen Hirudinaktivität liegt die die TAP Aktivität charakterisierende Inhibitionskonstante im nanomolaren Bereich.

#### Beispiel 6

[0056] Das Beispiel beschreibt die Konstruktion eines Plasmides, das für ein Hirudin-TAP-Derivat kodiert, welches der in Beispiel 5 beschriebenen Sequenz entspricht, N-terminal im Hirudin aber Ala statt Leucin trägt. Dazu wird das, in EPO 448 093 beschriebene Plasmid pCM7053 mit den Restriktionsenzyme BamH1 und Hind3 geöffnet und mit dem aus



dem in Beispiel 5 konstruierten Plasmid isolierten BamH1 Hirudin-TAP-Hind3 Fragment ligiert. Das entstandene Plasmid kodiert nun für das Protein Ala-Hir (2-63)-Ala Ile Glu Gly Arg TAP<sub>(1-60)</sub>(Gly34). Das Protein läßt sich mit zu Leu-Hirudinvarianten vergleichbaren Ausbeuten aktiv exprimieren.

Tabelle 1

Signalsequenz	Primärstruktur	SEQ ID NO.:
Kontrolle: cgtase-Ala-Hirudin	MKRNRFNTS AAIAISIALNTFF CSMQTIA	18
äußeres Membranprotein/Serratia marcescens	MKKTALALAVAGFATVAQA	19
opRF – Protein / Pseudomonas fluorescens	MKNTLGLAIGSLIAATSFGVLA	20
lambB-Protein / E.coli	MMITLRKLPLAVAVAAGVMS AQAMA	21
Furmat Reduktase /Shewanella putrificans	MKKMNLAVCIATLMGTAGLM GTAVA	22
β-Lactamase /pBR322	MSIQHFRVALIPFFAAFSLPVFA	23
alk. Phosphatase / E.coli	MKQSTIALALLPLLFTPVTKA	24
alk. Phosphatase / E. fergusonii	MKQSAIALALLSCLITPVSQA	25
Gyclodextrin Glucotransferase / Paenibacillus macerans	MKSRYKRLTSLALSLSMALGI SLPAWA	26
Outer Membrane Protein / S. typhimurium	MSFHHRVFKLSALSALFSHLSFA	27



# SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH  
 5 <120> Bifunktionale Fusionsproteine aus Hirudin und TAP  
 <130> AVE D-2000/A032  
 10 <140> 10033195.5  
 <141> 2000-07-07  
 15 <160> 27  
 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 20 <210> 1  
 <211> 55  
 <212> DNA  
 25 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen  
 30 Sequenz:Oligonucleotid  
 <220>  
 35 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(55)  
 <400> 1  
 40 cgaagagatc cctgaggaat acaaccgtct gtgcatcaaa ccgcgtgact ggatc 55  
 <210> 2  
 45 <211> 62  
 <212> DNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 50 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen  
 Sequenz:Oligonucleotid  
 55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(62)  
 60 <400> 2  
 gcattcgtcg atccagtcac gcggtttgat gcacagacgg ttgtattcct cagggatctc 60  
 65 tt 62

<210> 3	
<211> 80	5
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	10
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonucleotid	
<220>	15
<221> misc_feature	
<222> (1)..(80)	20
<400> 3	
gaatgcgact ccaacgaagg tggatgaacgt gcttacttcc gtaacggtaa aggtgggtgc 60	
gattccttct ggatctgccc 80	25
<210> 4	
<211> 80	30
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	35
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonucleotid	
<220>	40
<221> misc_feature	
<222> (1)..(80)	45
<400> 4	
tcttcggggc agatccagaa ggaatcgcaa ccacttttac cgttacggaa gtaagcacgt 60	
tcaccacctt cgttggagtc 80	50
<210> 5	
<211> 67	55
<212> DNA	
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	60
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonucleotid	
<220>	65

```

<221> misc_feature
<222> (1)..(67)

5
<400> 5
ggaagaccac accggtgctg actactactc ctctaccgt gactgcttca acgcttgcat 60
cta atga 67

10

<210> 6
<211> 65
15
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

20
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonucleotid

25
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(65)

30
<400> 6
agcttcatta gatgcaagcg ttgaagcagt cacggtagga ggagtagtag tcagcaccgg 60
tgtgg 65

35

<210> 7
<211> 412
40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

45
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:Oligonucleotid

50
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(412)

55
<400> 7
cgaagagatc cctgaggaat acaaccgtct gtgcatcaaa ccgcgtgact ggatcgacga 60
atgcttctct agggactcct tatgttgga gatacgtagt ttggcgact gacctagctg 120
60
cttacggact ccaacgaagg tggatgaacgt gcttacttcc gtaacggtaa aggtgggtgc 180
gattccttct ggactgaggt tgcttccacc acttgacga atgaaggcat tgccatttcc 240
accaacgcta aggaagacct tctgcccga agaccacacc ggtgctgact actactctc 300
ctaccgtgac tgcttcaacg cttgagacgg gccttctggt gtggccacga ctgatgatga 360
65
ggaggatggc actgacgaag ttgcgaacca tcta atgagt agattacttc ga 412

```

<210> 8	
<211> 70	
<212> DNA	5
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonucleotid	10
<220>	
<221> misc_feature	15
<222> (1)..(70)	
<400> 8	20
cgaagagatc cctgaggaat accttcagga tcctacaac cgtctgtgca tcaaaccgcg 60	
tgactggatc 70	
	25
<210> 9	
<211> 77	
<212> DNA	30
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonucleotid	35
<220>	
<221> misc_feature	40
<222> (1)..(77)	
<400> 9	45
gcattcgatc atccagtcac gcggtttgat gcacagacgg ttgtagggat cctgaaggta 60	
ttcctcaggg atctctt 77	
	50
<210> 10	
<211> 73	
<212> DNA	55
<213> Künstliche Sequenz	
<220>	
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Oligonucleotid	60
<220>	
<221> misc_feature	65

<222> (1)..(73)

<400> 10

5 cgaagagatc cctgaggaat acgctatcga aggtcggttac aaccgtctgt gcatcaaacc 60  
gcgtgactgg atc 73

10

<210> 11

<211> 80

<212> DNA

15

<213> Künstliche Sequenz

<220>

20

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonucleotid

<220>

25

<221> misc\_feature

<222> (1)..(80)

<400> 11

30

gcattcgctcg atccagtcac gcgggtttgat gcacagacgg ttgtaacgac cttcgatagc 60  
gtattcctca gggatctctt 80

35

<210> 12

<211> 82

<212> DNA

40

<213> Künstliche Sequenz

<220>

45

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonucleotid

<220>

50

<221> misc\_feature

<222> (1)..(82)

<400> 12

55

gacgaatgcg actccaacga aggtggtgaa cgtgcttact tccgtaacgg taaagggtgg 60  
tgcggttcct tctggatctg cc 82

60

<210> 13

<211> 80

<212> DNA

65

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Oligonucleotid

5

<220>

<221> misc\_feature

10

<222> (1)..(80)

<400> 13

tcttccgggc agatccagaa ggaaccgcaa ccacctttac cgttacggaa gtaagcacgt 60  
tcaccacctt cgttggagtc 80

15

20

<210> 14

<211> 120

<212> DNA

<213> Hirudo medicinalis

25

<400> 14

cttacgtata ctgactgcac tgaatctggt cagaacctgt gcctgtgcga aggatctaac 60  
gaatgcatat gactgacgtg acttagacca gtcttggaca cggacacgct tcctagattg 120

30

<210> 15

<211> 349

<212> PRT

<213> Hirudo medicinalis

35

40

<400> 15

Leu Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Glu Ser Gly Gln Asn Leu Cys Leu Cys  
1 5 10 15

45

Glu Gly Ser Asn Asx Ala Met His Ile Gly Thr Thr Thr Gly Cys Gly  
20 25 30

50

Gly Cys Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Gly  
35 40 45

Cys Ala Thr Cys Cys Thr Thr Gly Gly Ala Thr Cys Cys Gly Ala Cys  
50 55 60

55

Gly Gly Thr Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Cys Cys Ala Gly Thr  
65 70 75 80

60

Gly Cys Gly Thr Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Cys Cys Gly Gly Thr  
85 90 95

65

Cys Cys Cys Ala Thr Thr Gly Thr Thr Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly

100 105 110  
 5 Gly Ala Ala Cys Cys Thr Ala Gly Gly Cys Thr Gly Cys Cys Ala Cys  
 115 120 125  
 Thr Thr Thr Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Gly Cys Ala  
 10 130 135 140  
 Ala Val Cys Gly Gln Gly Asn Lys Cys Ile Leu Gly Ser Asp Gly Glu  
 15 145 150 155 160  
 Lys Asn Gln Cys Val Lys Pro Asn Ile Asx Ser Thr Asx Ile Ala Cys  
 165 170 175  
 20 Thr Gly Gly Cys Gly Ala Ala Gly Gly Thr Ala Cys Cys Cys Gly  
 180 185 190  
 25 Ala Ala Ala Cys Cys Gly Cys Ala Gly Thr Cys Thr Cys Ala Thr Ala  
 195 200 205  
 30 Ala Cys Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly Ala Cys Thr Thr Cys Gly Ala  
 210 215 220  
 Ala Gly Ala Gly Ala Thr Cys Cys Cys Thr Thr Gly Ala Cys Cys Gly  
 35 225 230 235 240  
 Cys Thr Thr Cys Cys Ala Thr Gly Gly Gly Gly Cys Thr Thr Thr Gly  
 40 245 250 255  
 Gly Cys Gly Thr Cys Ala Gly Ala Gly Thr Ala Thr Thr Gly Cys Thr  
 260 265 270  
 45 Gly Cys Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala Gly Cys Thr Thr Cys Thr Cys  
 275 280 285  
 50 Thr Ala Gly Gly Gly Ala Thr Gly Glu Gly Thr Pro Lys Pro Gln Ser  
 290 295 300  
 55 His Asn Asp Gly Asp Phe Glu Glu Ile Pro Gly Ala Gly Gly Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala  
 60 325 330 335  
 Thr Gly Gly Ala Ala Gly Thr Cys Glu Glu Tyr Leu Gln  
 340 345  
 65



<210> 16  
 <211> 120  
 <212> DNA  
 <213> Ornithodoros moubata

5

<400> 16  
 tacaaccgtc tgtgcatcaa accgcgtgac tggatcgacg aatgcgactc caacgaaggt 60  
 atgttggcag acacgtagtt tggcgcactg acctagctgc ttacgctgag gttgcttcca 120

10

15

<210> 17  
 <211> 300  
 <212> PRT  
 <213> Ornithodoros moubata

20

<400> 17  
 Tyr Asn Arg Leu Cys Ile Lys Pro Arg Asp Trp Ile Asp Glu Cys Asp  
 1 5 10 15

25

Ser Asn Glu Gly Gly Gly Thr Gly Ala Ala Cys Gly Thr Gly Cys Thr  
 20 25 30

30

Thr Ala Cys Thr Thr Cys Cys Gly Thr Ala Ala Cys Gly Gly Thr Ala  
 35 40 45

35

Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr Thr Gly Cys Gly Ala Thr Thr Cys  
 50 55 60

40

Cys Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Cys Thr Gly Cys Cys Cys Gly  
 65 70 75 80

45

Cys Cys Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly Ala  
 85 90 95

Ala Gly Gly Cys Ala Thr Thr Gly Cys Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys  
 100 105 110

50

Ala Cys Cys Ala Ala Cys Gly Cys Thr Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly  
 115 120 125

55

Ala Cys Cys Thr Ala Gly Ala Cys Gly Gly Gly Cys Gly Glu Arg Ala  
 130 135 140

60

Tyr Phe Arg Asn Gly Lys Gly Gly Cys Asp Ser Phe Trp Ile Cys Pro  
 145 150 155 160

65

Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Cys Ala Cys Cys Gly Gly Thr Gly

165 170 175  
 5 Cys Thr Gly Ala Cys Thr Ala Cys Thr Ala Cys Thr Cys Cys Thr Cys  
 180 185 190  
 10 Cys Thr Ala Cys Cys Gly Thr Gly Ala Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys  
 195 200 205  
 15 Ala Ala Cys Gly Cys Thr Thr Gly Cys Ala Thr Cys Cys Thr Thr Cys  
 210 215 220  
 20 Thr Gly Gly Thr Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Cys Thr  
 225 230 235 240  
 25 Gly Ala Thr Gly Ala Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Gly  
 245 250 255  
 30 Gly Cys Ala Cys Thr Gly Ala Cys Gly Ala Ala Gly Thr Thr Gly Cys  
 260 265 270  
 35 Gly Ala Ala Cys Gly Thr Ala Gly Glu Asp His Thr Gly Ala Asp Tyr  
 275 280 285  
 40 Tyr Ser Ser Tyr Arg Asp Cys Phe Asn Ala Cys Ile  
 290 295 300  
 45 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
 50 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen  
 <400> 18  
 Met Lys Arg Asn Arg Phe Phe Asn Thr Ser Ala Ala Ile Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
 55 Ile Ala Leu Asn Thr Phe Phe Cys Ser Met Gln Thr Ile Ala  
 20 25 30  
 60  
 65 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

5

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen

<400> 19

10

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Leu Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1

5

10

15

Thr Val Ala Gln Ala

20

15

20

<210> 20

<211> 22

<212> PRT

25

<213> Künstliche Sequenz

<220>

30

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen

<400> 20

Met Lys Asn Thr Leu Gly Leu Ala Ile Gly Ser Leu Ile Ala Ala Thr

1

5

10

15

35

Ser Phe Gly Val Leu Ala

20

40

45

<210> 21

<211> 25

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

50

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen

55

<400> 21

Met Met Ile Thr Leu Arg Lys Leu Pro Leu Ala Val Ala Val Ala Ala

1

5

10

15

60

Gly Val Met Ser Ala Gln Ala Met Ala

20

25

65

<210> 22  
 <211> 25  
 5 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 10 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen  
  
 <400> 22  
 15 Met Lys Lys Met Asn Leu Ala Val Cys Ile Ala Thr Leu Met Gly Thr  
     1                    5                    10                    15  
  
 Ala Gly Leu Met Gly Thr Ala Val Ala  
 20                    20                    25  
  
 25 <210> 23  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 30 <213> Künstliche Sequenz  
  
 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen  
 35  
 <400> 23  
 Met Ser Ile Gln His Phe Arg Val Ala Leu Ile Pro Phe Phe Ala Ala  
 40     1                    5                    10                    15  
  
 Phe Ser Leu Pro Val Phe Ala  
                     20  
 45  
  
 <210> 24  
 50 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Künstliche Sequenz  
  
 55 <220>  
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen  
  
 60 <400> 24  
 Met Lys Gln Ser Thr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Pro Leu Leu Phe Thr  
     1                    5                    10                    15  
  
 65 Pro Val Thr Lys Ala  
                     20

```
<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
```

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen

<400> 25  
Met Lys Gln Ser Ala Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Cys Leu Ile Thr  
1 5 10 15

Pro Val Ser Gln Ala  
20

```
<210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
```

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen

<400> 26  
Met Lys Ser Arg Tyr Lys Arg Leu Thr Ser Leu Ala Leu Ser Leu Ser  
1 5 10 15

Met Ala Leu Gly Ile Ser Leu Pro Ala Trp Ala  
20 25

```
<210> 27
<211> 24
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz
```

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Mutagen

<400> 27  
Met Ser Phe His His Arg Val Phe Lys Leu Ser Ala Leu Ser Leu Ala  
1 5 10 15

Leu Phe Ser His Leu Ser Phe Ala  
20

Patentansprüche

1. Bifunktionales Fusionsprotein aus Hirudin oder einer Variante von Hirudin und TAP (Tick Anticoagulant Peptide) oder einer Variante von TAP.
- 5 2. Bifunktionales Fusionsprotein nach Anspruch 1, enthaltend die Hirudin-Variante [Leu<sup>1</sup>, Thr<sup>2</sup>]-63-Desulfatohirudin oder einen Teil davon.
3. Bifunktionales Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 und 2 enthaltend die Aminosäuren 1-63 aus Sequenz SEQ ID NO. 15.
4. Bifunktionales Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei TAP die Sequenz SEQ ID NO. 17 hat.
- 10 5. Bifunktionales Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Variante von TAP einem Teil der Sequenz SEQ ID NO. 17 entspricht.
6. Bifunktionales Fusionsprotein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, wobei Hirudin oder dessen Variante und TAP oder dessen Variante über einen Spacer, der aus einer oder mehreren Aminosäuren besteht, verbunden sind.
- 15 7. Bifunktionales Fusionsprotein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Fusionsprotein an einen Träger gekoppelt ist.
8. Bifunktionales Fusionsprotein nach Anspruch 7, wobei der Träger Polyethylenglycol (PEG) oder Dextran ist.
9. Bifunktionales Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, enthaltend ein Signalpeptid.
10. DNA kodierend für ein bifunktionales Fusionsprotein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9.
- 20 11. Plasmid, enthaltend eine DNA nach Anspruch 10.
12. Zelle, enthaltend eine DNA nach Anspruch 10 oder ein Plasmid nach Anspruch 11.
13. Verfahren zur Herstellung eines bifunktionalen Fusionsproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei eine DNA, die für das bifunktionale Fusionsprotein kodiert, in eine Zelle eingebracht und exprimiert wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Zelle eine E. coli Zelle ist.
- 25 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei das bifunktionale Fusionsprotein aus dem Medium bzw. Zellüberstand aufgereinigt wird.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei das bifunktionale Fusionsprotein anschließend gefriergetrocknet wird.
17. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels wobei ein bifunktionales Fusionsprotein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 hergestellt und mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger und gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen gemischt wird.
- 30 18. Verfahren zur Herstellung eines nasal applizierbaren Arzneimittels wobei ein bifunktionales Fusionsprotein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 hergestellt, mit einem geeigneten pharmazeutischen Träger und gegebenenfalls weiteren Zusatzstoffen gemischt und gefriergetrocknet wird.
19. Arzneimittel enthaltend ein bifunktionales Fusionsprotein nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9.
- 35 20. Nasal Spray enthaltend ein bifunktionales Fusionsprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

Figur 1

SEQ ID NO. 7

1/2Bstb1

hir63\_zehna1

SEQ ID NO. 7

CGAAGAGATCCCTGAGGAATACAACCGTCTGTGCATCAAACCGCGTGACTGGATCGACGAATGC  
TTCTCTAGGGACTCCTTATGTTGGCAGATACGTAGTTTGGCGCACTGACCTAGCTGCTTACG  
hir63\_zehna2

zehna3

GACTCCAACGAAGGTGGTGAACGTGCTTACTTCCGTAACGGTAAAGGTGGTTGCGATTCTTCTGGA  
CTGAGGTTGCTTCCACCACTTGCACGAATGAAGGCATTGCCATTTCCACCAACGCTAAGGAAGACCT

zehna4

zehna5

TCTGCCCCGAAGACCACACCGGTGCTGACTACTACTCCTCCTACCGTGACTGCTTCAACGCTTG  
AGACGGGCCTTCTGGTGTGGCCACGACTGATGATGAGGAGGATGGCACTGACGAAGTTGCGAAC  
zehna6

CATCTAATGA

GTAGATTACTTCGA

½ Hind3

Figur 2:

SEQ ID NO. 8

hir65\_DP\_zehna1:

GluGluTyrLeuGlnAspProTyrAsn

5' - CGAAGAGATCCCTGAGGAATACCTTCAGGATCCCTACAACCGTCTGTGCATCAAACCGCGTGACTGGATC

SEQ ID NO. 9

hir65\_DP\_zehna2:

5' - GCATTTCGTCGATCCAGTACGCGGTTTGATGCACAGACGGTTGTAGGGATCCTGAAG  
GTATTCCTCAGGGATCTC TT -3'



Figur 3:

SEQ ID NO. 10 (zehna1)

Ala Ile Glu Gly Arg Tyr  
5' - CGAAGAGATCCCTGAGGAATACGCTATCGAAGGTCGTTACAACCGTCTGTGCATCAAACCGCGT  
GACTGGATC - 3'

SEQ ID NO. 11 (zehna2)

5' - GCATTTCGTCGATCCAGTCACGCGGTTTGATGCACAGACGGTTGTAACGACCTTCGATAGC  
GTATTCCTCAGGGATCTCTT - 3'

SEQ ID NO. 12 (zehna3)

5' - GACGAATGCGACTCCAACGAAGGTGGTGAACGTGCTTACTTCCGTAACGGTAAAGGTGGT  
TGCGGTTCCTTCTGGATCTGCC - 3'  
Gly

SEQ ID NO. 13 (zehna4)

5' - TCTTCCGGGCAGATCCAGAAGGAACCGCAACCACCTTTACCGTTACGGAAGTAAGCACGT  
TCACCACCTTCGTTGGAGTC - 3'

Fig. 4 :

DNA- Sequenz kodierend für Refludan ( Leu – Hirudin )

SEQ ID NO. 14

CTTACGTATACTGACTGCACTGAATCTGGTCAGAACCTGTGCCTGTGCGAAGGATCTAAC  
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
GAATGCATATGACTGACGTGACTTAGACCAGTCTTGGACACGGACACGCTTCCTAGATTG

SEQ ID NO. 15

→ L T Y T D C T E S G Q N L C L C E G S N -

BamHI  
|  
GTTTGCGGCCAGGGTAACAAATGCATCCTTGGATCCGACGGTGAAAAGAACCAGTGCGTT  
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
CAAACGCCGGTCCCATTTGTTTACGTAGGAACCTAGGCTGCCACTTTTCTTGGTCACGCAA  
V C G Q G N K C I L G S D G E K N Q C V -

KpnI  
|  
ACTGGCGAAGGTACCCCGAAACCGCAGTCTCATAACGACGGCGACTTCGAAGAGATCCCT  
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
TGACCGCTTCCATGGGGCTTTGGCGTCAGAGTATTGCTGCCGCTGAAGCTTCTCTAGGGA  
T G E G T P K P Q S H N D G D F E E I P -

BstBI  
|  
GAGGAATACCTTCAG  
181 -----+----- 195  
CTCCTTATGGAAGTC  
E E Y L Q -

Figur 5:

Synthetische DNA – Sequenz kodierend für TAP zugeordnet

SEQ ID NO. 16

└─┐  
1 TACAACCGTCTGTGCATCAAACCGCGTGA CTGGATCGACGAATGCGACTCCAACGAAGGT  
-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
ATGTTGGCAGACACGTAGTTTGGCGCACTGACCTAGCTGCTTACGCTGAGGTTGCTTCCA

SEQ ID NO. 17

└─┐ Y N R L C I K P R D W I D E C D S N E G  
  
61 GGTGAACGTGCTTACTTCCGTAACGGTAAAGGTGGTTGCGATTCTTCTGGATCTGCCCCG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
CCTTGCACGAATGAAGGCATTGCCATTTCCACCAACGCTAAGGAAGACCTAGACGGGC  
  
G E R A Y F R N G K G G C D S F W I C P  
  
121 GAAGACCACACCGGTGCTGACTACTACTCCTACCGTGA CTGCTTCAACGCTTGCATC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
CTTCTGGTGTGGCCACGACTGATGATGAGGAGGATGGCACTGACGAAGTTGCGAACGTAG  
  
E D H T G A D Y Y S S Y R D C F N A C I